



PCT

**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :  C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 9/00, C07K 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/68, C12N 15/11, A61K 31/70, 38/17		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/55316</b>
(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. September 2000 (21.09.00)			
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE00/00767		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum:	8. März 2000 (08.03.00)		
(30) Prioritätsdaten:			
199 11 992.9	17. März 1999 (17.03.99)	DE	
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): GRUMMT, Ingrid [DE/DE]; Am Pferchelhang 39, D-69118 Heidelberg (DE). VIN- GRON, Martin [AT/DE]; Edingerstrasse 11, D-69123 Hei- delberg (DE).			<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) Title: RNA POLYMERASE I TRANSCRIPTION FACTOR TIF-IA

(54) Bezeichnung: RNA POLYMERASE I TRANSKRIPTIONSFAKTOR TIF-1A

**(57) Abstract**

The invention relates to an RNA polymerase I transcription factor TIF-IA and related proteins the concentration and/or activity of which is correlated with the cell proliferation rate, and to DNA sequences encoding said proteins. The invention also relates to ligands and antagonists binding to RNA polymerase I transcription factor TIF-IA or related proteins, and to antisense RNAs or ribozymes directed against the expression of TIF-IA. The inventive compounds are useful in the prophylaxis or treatment of diseases that are related to an increased or a reduced cell proliferation.

## (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA und dazu verwandte Proteine, deren Konzentration und/oder Aktivität mit der Zellproliferationsrate korreliert sind, sowie diese Proteine codierende DNA-Sequenzen. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner an RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA bzw. dazu verwandte Proteine bindende Liganden, Antagonisten, sowie gegen die TIF-IA Expression gerichtete Antisense-RNAs bzw. Ribozyme. Diese Verbindungen sind zur Prävention oder Behandlung von Erkrankungen von Nutzen, die mit einer erhöhten oder verringerten Zellproliferation in Zusammenhang stehen.

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

<b>AL</b>	Albanien	<b>ES</b>	Spanien	<b>LS</b>	Lesotho	<b>SI</b>	Slowenien
<b>AM</b>	Armenien	<b>FI</b>	Finnland	<b>LT</b>	Litauen	<b>SK</b>	Slowakei
<b>AT</b>	Österreich	<b>FR</b>	Frankreich	<b>LU</b>	Luxemburg	<b>SN</b>	Senegal
<b>AU</b>	Australien	<b>GA</b>	Gabun	<b>LV</b>	Leitland	<b>SZ</b>	Swasiland
<b>AZ</b>	Aserbaidschan	<b>GB</b>	Vereinigtes Königreich	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Tschad
<b>BA</b>	Bosnien-Herzegowina	<b>GE</b>	Georgien	<b>MD</b>	Republik Moldau	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbados	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagaskar	<b>TJ</b>	Tadschikistan
<b>BE</b>	Belgien	<b>GN</b>	Guinea	<b>MK</b>	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	<b>TM</b>	Turkmenistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Griechenland	<b>ML</b>	Mali	<b>TR</b>	Türkei
<b>BG</b>	Bulgarien	<b>HU</b>	Ungarn	<b>MN</b>	Mongolei	<b>TT</b>	Trinidad und Tobago
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Irland	<b>MR</b>	Mauretanien	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brasilien	<b>IL</b>	Israel	<b>MW</b>	Malawi	<b>UG</b>	Uganda
<b>BY</b>	Belarus	<b>IS</b>	Island	<b>MX</b>	Mexiko	<b>US</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>CA</b>	Kanada	<b>IT</b>	Italien	<b>NE</b>	Niger	<b>UZ</b>	Usbekistan
<b>CF</b>	Zentralafrikanische Republik	<b>JP</b>	Japan	<b>NL</b>	Niederlande	<b>VN</b>	Vietnam
<b>CG</b>	Kongo	<b>KE</b>	Kenia	<b>NO</b>	Norwegen	<b>YU</b>	Jugoslawien
<b>CH</b>	Schweiz	<b>KG</b>	Kirgisistan	<b>NZ</b>	Neuseeland	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KP</b>	Demokratische Volksrepublik Korea	<b>PL</b>	Polen		
<b>CM</b>	Kamerun	<b>KR</b>	Republik Korea	<b>PT</b>	Portugal		
<b>CN</b>	China	<b>KZ</b>	Kasachstan	<b>RO</b>	Rumänien		
<b>CU</b>	Kuba	<b>LC</b>	St. Lucia	<b>RU</b>	Russische Föderation		
<b>CZ</b>	Tschechische Republik	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SD</b>	Sudan		
<b>DE</b>	Deutschland	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SE</b>	Schweden		
<b>DK</b>	Dänemark	<b>LR</b>	Liberia	<b>SG</b>	Singapur		

**RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA**

Die vorliegende Erfindung betrifft einen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA und dazu verwandte Proteine, deren Konzentration und/oder Aktivität mit der Zellproliferationsrate korreliert sind, sowie diese Proteine codierende DNA-Sequenzen. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner an RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA bzw. dazu verwandte Proteine bindende Liganden, beispielsweise Antikörper, Antagonisten, sowie gegen die TIF-IA Expression gerichtete Antisense-RNAs bzw. Ribozyme. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Arzneimittel und Diagnoseverfahren, bei denen die vorstehenden Verbindungen zur Anwendung kommen.

Die Synthese ribosomaler RNAs (rRNAs) durch RNA Polymerase I (Pol I) wird in Abhängigkeit von externen Signalen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormonen, Nährstoffen und Effektoren für Wachstum und Differenzierung äußerst effizient reguliert. Dementsprechend ist in Tumorzellen, die unkontrolliertes Zellwachstum aufweisen, die rRNA-Syntheserate drastisch erhöht (Grummt, I.: "Regulation of Mammalian Ribosomal Gene Transcription by RNA Polymerase I.", Progr. NAR & Mol. Biol. (1999) 62, 109-154). Die molekularen Mechanismen, die die Transkriptionsaktivität von Klasse I-Genen mit dem Zellwachstum verknüpfen, sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Die Aufklärung der Prozesse, durch die extrazelluläre Signale in den Zellkern bzw. Nukleolus übertragen werden, um dort die Transkriptionsrate positiv oder negativ zu beeinflussen, erfordert daher die strukturelle und funktionelle Analyse der am Transkriptionsprozess beteiligten Proteinfaktoren, die Untersuchung deren Wechselwirkungen sowie die Identifizierung modifizierender Enzyme, beispielsweise Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, die die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von der zellulären Proliferationsrate regulieren.

Ein Faktor, der für die wachstumsabhängige Regulation der rDNA-Transkription verantwortlich ist, ist TIF-IA, dessen Konzentration und/oder Aktivität in Abhängigkeit von der Proliferationsrate der Zellen fluktuiert. TIF-IA wurde bereits 1983 funktionell identifiziert (Buttgereit et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), 8165-8180) und in den folgenden Jahren biochemisch charakterisiert (Mahajan und Thompson, J.Biol.Chem.265 (1990), 16225-16233; Schnapp et al., Mol.Cell.Biol.13 (1993), 6723-6732). Diese Untersuchungen lieferten folgende wichtige Befunde: (1) TIF-IA ist ein essentieller Initiationsfaktor für Pol I, der dem bakteriellen  $\sigma$ -Faktor funktionell homolog zu sein scheint. Wie für den  $\sigma$ -Faktor gezeigt, ist auch TIF-IA mit der Initiationskompetenten Form der Pol I, dem Pol I "Holo-Enzym", assoziiert und wird nach der Initiationsreaktion von Pol I freigesetzt; (2) die Menge und/oder Aktivität von TIF-IA korreliert mit der Proliferationsrate der Zellen, d.h. Extrakte aus Wachstumsarrestierten Zellen sind transkriptionell inaktiv, sie können jedoch durch Zusatz von partiell gereinigtem TIF-IA komplementiert werden; und (3) die biochemische Aufreinigung von TIF-IA ergab, daß weniger als tausend TIF-IA-Moleküle selbst in exponentiell wachsenden Zellen vorhanden sind.

Aufgrund der biologischen Eigenschaften von TIF-IA kann davon ausgegangen werden, daß dieser bei der Prävention und/oder Behandlung von Erkrankungen nützlich sein kann, bei der eine Stimulation der Zellproliferation durch eine Aktivierung der zellulären rRNA-Synthese therapeutisch sinnvoll ist, beispielsweise zur Unterstützung der Gewebsregeneration nach Verletzungen oder Strahlentherapie. Andererseits kann auch die Möglichkeit der Inaktivierung von TIF-IA zur Proliferationshemmung bzw. zur Prävention und/oder Behandlung von Erkrankungen verwendet werden, die mit einer erhöhten Zellproliferation einhergehen, beispielsweise Tumorerkrankungen. Eine solche Inaktivierung kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen, beispielsweise auf genetischer Ebene ("Knock out", Hemmung der Translation durch Antisense-RNAs oder Ribozyme) oder Protein-Ebene (TIF-IA hemmende

Liganen oder Antagonisten, Kinase/Phosphatase-Inhibitoren, Hemmung der Bindung von TIF-IA an Pol I etc.). Voraussetzung für die vorstehend diskutierten therapeutischen Möglichkeiten ist allerdings, daß TIF-IA als Protein in ausreichenden Mengen und in möglichst reiner Form zur Verfügung steht bzw. das TIF-IA codierende Gen, was einerseits dessen rekombinante Herstellung ermöglicht, andererseits auch eine auf Gentherapie basierende Behandlung. Allerdings war bisher selbst die partielle Reinigung von TIF-IA äußerst schwierig, da, wie bereits ausgeführt, das Protein nur in sehr geringen Mengen in der Zelle vorhanden und vermutlich darüber hinaus sehr labil ist. Ausgehend von mehreren hundert Litern kultivierter Zellen konnte TIF-IA zwar über eine Kombination von neun chromatographischen Schritten gereinigt werden, wobei die TIF-IA-Aktivität mit einem 75 kDa Protein korreliert (Schnapp et al., supra), allerdings waren bisher weder die Reinheit noch die Menge an biochemisch gereinigtem TIF-IA ausreichend, um dieses therapeutisch einsetzen bzw. um partielle Aminosäuresequenzen bestimmen zu können, was die Entwicklung von Sonden für das TIF-IA codierende Gen erlauben würde.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, (1) das TIF-IA-Protein in ausreichender Menge und reiner Form und (2) das TIF-IA codierende Gen bereitzustellen, was beispielsweise dessen rekombinante Herstellung gestattet.

Die Lösung dieses technischen Problems wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erzielt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine DNA-Sequenz, die einen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA mit der in Figur 2 gezeigten Aminosäuresequenz codiert, wobei in einer bevorzugten Ausführungsform die DNA-Sequenz die in Figur 2 gezeigte Nucleinsäuresequenz enthält.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Isolierung einer cDNA-Sequenz, die humanen TIF-IA codiert. Da es bisher nicht möglich war, TIF-IA in solchen Mengen und in solcher Reinheit bereitzustellen, daß - beispielsweise von einer partiellen Aminosäuresequenz ausgehend - Sonden für die erfolgreiche Clonierung des Gens entwickelt werden konnten, wurde in der vorliegenden Erfindung eine andere Strategie zur Bestimmung des TIF-IA codierenden Gens eingeschlagen. Dabei wurde in Genbanken nach DNA-Sequenzen gesucht, die Homologie zu Genen aufweisen, die für die Pol I Transkription in Hefe verantwortlich sind. Diese Vorgehensweise, die schließlich zur Isolierung eines TIF-IA codierenden Clons führte, wird in den nachstehenden Beispielen ausführlich beschrieben.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit den biologischen Eigenschaften eines RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA codiert, die sich von der DNA-Sequenz von Figur 2 in der Codonsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet, die mit den vorstehenden DNA-Sequenzen hybridisiert oder die ein Fragment, eine allelische Variante oder eine andere Variante der vorstehenden DNA-Sequenzen ist.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff "hybridisieren" bezieht sich auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen als Lösung 5xSSPE, 1% SDS, 1xDenhardts-Lösung verwendet wird und/oder die Hybridisierungstemperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C liegen. Nach der Hybridisierung wird vorzugsweise zuerst mit 2xSSC, 1% SDS und danach mit 0,2xSSC bei Temperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C gewaschen (zur Definition von SSPE, SSC und Denhardts-Lösung siehe Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Besonders bevorzugt sind stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al ., supra, beschrieben sind.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe "Varianten" oder "Fragment" umfassen DNA-Sequenzen, die sich gegenüber den in Figur 2 angegebenen Sequenzen durch Deletion(en), Insertion(en), Austausch(e) und/oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen unterscheiden bzw. ein Fragment des ursprünglichen Nucleinsäuremoleküls umfassen, wobei das durch diese DNA-Sequenzen codierte Protein noch die biologischen Eigenschaften von TIF-IA aufweist und in Säugern biologisch aktiv ist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Nucleinsäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., supra. Der Fachmann ist auch in der Lage, zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codiertes Protein noch über die biologischen Eigenschaften von TIF-IA verfügt.

Durch die Erniedrigung oder Hemmung der Expression der vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen, kann die Synthese von TIF-IA bzw. verwandten Proteinen verringert oder eliminiert werden, was beispielsweise bei den in der Einleitung beschriebenen Krankheitszuständen wünschenswert ist. Daher betrifft eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Antisense-RNA, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie zu den vorstehenden DNA-Sequenzen komplementär ist und die Synthese des von diesen DNA-Sequenzen codierten TIF-IA verringern oder hemmen kann und ein Ribozym, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es zu den vorstehenden DNA-Sequenzen komplementär ist und an die von diesen DNA-Sequenzen transkribierte RNA spezifisch binden und diese spalten kann, wodurch die Synthese des von diesen DNA-Sequenzen codierten TIF-IA ebenfalls verringert oder gehemmt wird. Vorzugsweise sind diese Antisense-RNAs und Ribozyme zu einer codierenden Region der mRNA komplementär. Der Fachmann ist in der Lage, ausgehend von den offebarten DNA-Sequenzen, geeignete Antisense-RNAs herzustellen und anzuwenden. Geeignete Vorgehensweisen sind beispielsweise in EB-B1 0 223 399 oder EP-A1 0 458 beschrieben. Ribozyme sind RNA-Enzyme und

bestehen aus einem einzelnen RNA-Strang. Diese können andere RNAs intermolekular spalten, beispielsweise die von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen transkribierten mRNAs. Diese Ribozyme müssen prinzipiell über zwei Domänen verfügen, (1) eine katalytische Domäne und, (2) eine Domäne, die zu der Ziel-RNA komplementär ist und an diese binden kann, was die Voraussetzung für eine Spaltung der Ziel-RNA ist. Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen ist es inzwischen möglich, spezifische Ribozyme zu konstruieren, die eine gewünschte RNA an einer bestimmten, vorgewählten Stelle schneiden (siehe beispielsweise Tanner et al., in: *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Inc. (1993), 415-426). Vorzugsweise weisen die erfindungsgemäßen Antisense-RNAs bzw. Ribozyme einen Bereich auf, der zu der Ziel-DNA über eine Länge von 12 Nucleotiden, bevorzugt 15 Nucleotiden, stärker bevorzugt 20 Nucleotiden komplementär ist.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. die die vorstehend beschriebenen Antisense-RNAs oder Ribozyme codierenden DNAs können auch in einen Vektor bzw. Expressionsvektor inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese DNA-Sequenzen enthaltende Vektoren bzw. Expressionsvektoren. Die Bezeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (pUC18, pBR322, pBlueScript etc.), auf ein Virus oder ein anderes geeignetes Vehikel. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße DNA-Molekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Prokaryoten, beispielsweise *E.coli*, zählen der lac-, trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Expression in Eukaryoten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe und der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, CMV- oder SV40-Enhancer für die Expression in tierischen Zellen. Weitere Beispiele für

geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor. Zu geeigneten Expressionsvektoren für *E.coli* zählen beispielsweise pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8, wobei letzterer bevorzugt ist. Zu den für die Expression in Hefe geeigneten Vektoren zählen pY100 und Ycpad1, für die Expression in Säugerzellen pMSXND, pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4. Zu den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren zählen auch von Baculovirus abgeleitete Vektoren für die Expression in Insektenzellen, beispielsweise pAcSGHisNT-A.

Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise *in vitro*-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie *in vivo*-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., *supra*, beschrieben sind. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid codierenden DNA inseriert werden, so daß die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen beispielsweise in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend beschriebenen Vektoren enthaltende Wirtszellen. Zu diesen Wirtszellen zählen Bakterien (beispielsweise die *E.coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG13009), Hefe, vorzugsweise *S. cerevisiae*, Insektenzellen, vorzugsweise sf9-Zellen, und Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen. Bevorzugte Säugerzellen sind CHO-, VERO-, BHK-, HeLa-, COS-, MDCK, 293- und WI38-Zellen. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierten RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA bzw. Proteine mit dessen biologischer Aktivität sowie Verfahren zu deren rekombinanter Herstellung unter Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionsvektoren. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt die Kultivierung der vorstehend beschriebenen Wirtszellen unter Bedingungen, die die Expression des Proteins (bzw. Fusionsproteins) erlauben (vorzugsweise stabile Expression), und die Gewinnung des Proteins aus der Kultur oder aus den Wirtszellen. Dem Fachmann sind Bedingungen bekannt, transformierte bzw. transfizierte Wirtszellen zu kultivieren. Geeignete Reinigungsverfahren (beispielsweise préparative Chromatographie, Affinitätschromatographie, beispielsweise Immunoaffinitätschromatographie, HPLC etc.) sind ebenfalls allgemein bekannt.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft Liganden gegen die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Proteine (TIF-IA oder verwandte Proteine). Diese Liganden können beispielsweise in diagnostischen Assays verwendet werden oder für therapeutische Zwecke, wobei es nach Anlagerung an das Zielmolekül, d.h. TIF-IA, zu dessen Hemmung kommt, d.h. es kann nicht mehr an sein Ziel, Pol I, binden und diese somit nicht mehr aktivieren. Verfahren zur Isolierung bzw. Synthese solcher Liganden sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise können möglicherweise nützliche aktivitätshemmende Verbindungen in Extrakten von natürlichen Produkten als Ausgangsmaterial gescreent werden. Solche Extrakte können beispielsweise aus Pilzen, Actinomyceten, Algen, Insekten, Protozoen, Pflanzen und Bakterien stammen.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Liganden um einen Antikörper oder ein Fragment davon. Diese Antikörper können monoclonale, polyclonale oder synthetische Antikörper sein oder Fragmente davon. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff "Fragment" alle Teile des monoklonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder "single chain Fv"-Fragmente),

welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Antikörpern um monoklonale Antikörper. Die erfindungsgemäßen Antikörper können gemäß Standardverfahren hergestellt werden, wobei vorzugsweise der von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierte TIF-IA oder ein synthetisches Fragment davon als Immunogen dienen. Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der genannte monoklonale Antikörper ein aus einem Tier (z.B. Maus) stammender Antikörper, ein humanisierter Antikörper oder ein chimärer Antikörper oder ein Fragment davon. Chimäre, menschlichen Antikörper ähnelnde oder humanisierte Antikörper besitzen eine herabgesetzte potentielle Antigenität, jedoch ist ihre Affinität gegenüber dem Ziel nicht herabgesetzt. Die Herstellung von chimären und humanisierten Antikörpern bzw. von den menschlichen Antikörpern ähnelnden Antikörpern wurde ausführlich beschrieben (siehe beispielsweise Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 10029, und Verhoeyan et al., Science 239 (1988), 1534). Humanisierte Immunglobuline weisen variable Grundgerüstbereiche auf, die im wesentlichen von einem humanen Immunglobulin stammen (mit der Bezeichnung Akzeptor-Immunglobulin) und die Komplementarität der determinierenden Bereiche, die im wesentlichen von einem nicht-menschlichen Immunglobulin (z.B. von der Maus) stammen (mit der Bezeichnung Donor-Immunglobulin). Die (der) konstante(n) Bereich(e) stammt (stammen), falls vorhanden, auch im wesentlichen von einem menschlichen Immunglobulin. Bei der Verabreichung an menschliche Patienten bieten humanisierte (sowie die menschlichen) Antikörper eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern von Mäusen oder anderen Spezies: (a) das menschliche Immunsystem sollte das Grundgerüst oder den konstanten Bereich des humanisierten Antikörpers nicht als fremd erkennen und daher sollte die Antikörperantwort gegen einen solchen injizierten Antikörper geringer ausfallen als

gegen einen vollständig fremden Maus-Antikörper oder einen partiell fremden chimären Antikörper; (b) da der Effektorbereich des humanisierten Antikörpers menschlich ist, interagiert er besser mit anderen Teilen des menschlichen Immunsystems, und (c) injizierte humanisierte Antikörper weisen eine Halbwertszeit auf, die im wesentlichen zu der von natürlich vorkommenden menschlichen Antikörpern äquivalent ist, was es erlaubt, kleinere und weniger häufige Dosen im Vergleich zu Antikörpern anderer Spezies zu verabreichen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können beispielsweise auch zur Immunpräzipitation des erfindungsgemäßen TIF-IA, zur Isolierung verwandter Proteine aus cDNA-Expressionsbanken oder für diagnostische Zwecke (siehe unten) verwendet werden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Hybridom, das den vorstehend beschriebenen monoklonalen Antikörper erzeugt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Antagonisten für TIF-IA bzw. damit verwandte Proteine. Diese erlauben *in vivo* ebenfalls eine Hemmung der rRNA-Transkriptionsrate. Zu den möglichen Antagonisten zählen Peptide, die dadurch gewonnen werden können, daß beispielsweise Oligopeptide mit nach dem Zufallsprinzip erzeugten Sequenzen gescreent werden, um so TIF-IA Inhibitoren auffinden zu können. Solche Peptide können direkt als Wirkstoffe verwendet werden, oder um die Orientierung oder Lage einer funktionellen Gruppe aufzufinden, die TIF-IA Aktivität hemmen kann, was wiederum zum Entwurf und dem Austesten eines inhibitorischen kleinen Moleküls führt, oder wobei das Peptid das Rückgrat für chemische Modifizierung wird, die dessen pharmakologischen Verwendungsmöglichkeiten steigern. Bei dem Peptid kann es sich um strukturelle Imitatoren handeln, es können aber auch Molekülmodulierungsprogramme verwendet werden, um Imitatoren - basierend auf der charakteristischen Sekundär- und/oder Tertiärstruktur von TIF-IA - zu entwerfen. Solche strukturellen Imitatoren können dann *in vivo* als TIF-IA Inhibitoren verwendet werden. Zu den als Antagonisten

wirksamen Verbindungen zählen auch beispielsweise inaktive TIF-IA Moleküle. Wenn diese in ausreichend hoher Konzentration exprimiert bzw. verabreicht werden, führt dies zur Verarmung an notwendigen aktiven TIF-IA Molekülen und dadurch fungieren diese als TIF-IA Antagonisten.

Die vorliegende Erfindung erlaubt auch die Durchführung therapeutischer Maßnahmen bei den vorstehend diskutierten Störungen der Zellproliferation bzw. den damit in Zusammenhang stehenden Erkrankungen, d.h. die vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, Antisense-RNAs, Ribozyme, Liganden und Antagonisten können auch zur Herstellung eines Arzneimittels, beispielsweise zur Kontrolle der Expression des TIF-IA (oder des damit verwandten Proteins) oder zum Austausch einer mutierten Form des Gens gegen eine funktionelle Form verwendet werden, somit beispielsweise einerseits zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder der Behandlung von Erkrankungen, die mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert sind oder zur Hemmung der Zellproliferation, insbesondere Tumorerkrankungen, andererseits zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder der Behandlung von Erkrankungen, die mit einer verringerten Zellproliferation assoziiert sind oder zur Stimulation der Zellproliferation, beispielsweise zur Förderung der Geweberegenation. Beispielsweise kann der erfindungsgemäße TIF-IA in Säuger, insbesondere den Menschen, durch übliche Maßnahmen eingebracht werden. Hierzu kann es günstig sein, das Protein an ein vom jeweiligen Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder Rinderserumalbumin (BSA), zu koppeln. Auch kann eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, Antisense-RNA oder Ribozym in Säuger, insbesondere den Menschen, eingebracht und exprimiert werden. Mit einem erfindungsgemäßen Liganden, beispielsweise einem monoklonalen Antikörper, kann die Expression von TIF-IA bzw. der verwandten Proteine kontrolliert und reguliert werden. Antagonisten für TIF-IA können ebenfalls dazu verwendet werden, um so die Wirkung von aktivem TIF-IA abzuschwächen oder ganz zu blockieren.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Arzneimittel, das die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen, Antisense-RNA, das Ribozym, den Expressionsvektor, das erfindungsgemäße Protein, den Liganden oder Antagonisten enthält. Dieses Arzneimittel enthält gegebenenfalls zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphatgepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Verabreichung der Arzneimittel kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, dem Stadium der Erkrankung, der Art der Verabreichung etc.

Vorzugsweise werden die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen in einen für die Gentherapie geeigneten Vektor inseriert, beispielsweise unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, und in die Zellen eingeschleust. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen enthaltende Vektor ein Virus, beispielsweise ein Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Adenovirus. Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV. Für Zwecke der Gentherapie können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., Biotechniques 6 (1988), 682). Diese Gentherapie kann sowohl für die Erhöhung der Proliferationsrate der Zellen (beispielsweise mit einem Vektor, der das Gen für aktiven TIF-IA enthält) als auch für eine Verringerung der Proliferationsrate (mit einem Vektor,

der ein Gen für ein Ribozym, eine Antisense-RNA oder eine inaktive Form von TIF-IA ("knock-out") enthält) Anwendung finden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es auch, Störungen der TIF-IA Expression bzw. Zellproliferation auf genetischer Ebene zu untersuchen. Mit einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz bzw. davon abgeleiteten Sonden oder Primern kann in Säugern, insbesondere dem Menschen, festgestellt werden, ob sie ein verändertes TIF-IA Gen enthalten, das zu einer mutierten Form des Proteins führt, die nicht länger biologisch aktiv ist, oder ob beispielsweise TIF-IA zu gering oder zu stark exprimiert wird. Dazu kann der Fachmann übliche Verfahren, wie Reverse Transkription, PCR, LCR, Hybridisierung und Sequenzierung durchführen. Auch die erfindungsgemäßen Liganden, beispielsweise die Antikörper oder Fragmente davon, eignen sich für die Diagnostik, d.h. beispielsweise zum Nachweis des Vorhandenseins und/oder der Konzentration des TIF-IA, einer verkürzten oder verlängerten Form dieses Proteins etc., in einer Probe. Die Antikörper können beispielsweise in Immunoassays in Flüssigphase oder an einen festen Träger gebunden werden. Dabei können die Antikörper auf verschiedene Art und Weise markiert sein. Geeignete Marker und Markierungsverfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt. Beispiele für Immunassays sind ELISA und RIA.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Diagnoseverfahren zum Nachweis einer gestörten TIF-IA Expression, bei dem man eine Probe mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder dem erfindungsgemäßen Liganden, beispielsweise einem monoklonalen Antikörper oder einem Fragment davon in Berührung bringt und sodann direkt oder indirekt bestimmt, ob sich die Konzentration, Länge und/oder Sequenz des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder der diesen codierenden mRNA im Vergleich zu einer Kontrollprobe unterscheiden. Die für dieses Diagnoseverfahren verwendbaren Sonden umfassen auch auf den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen basierende Primer, beispielsweise für eine PCR.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung einen diagnostischen Kit zur Durchführung des vorstehend beschriebenen Diagnoseverfahrens, der eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Liganden, beispielsweise einen monoklonalen Antikörper oder das Fragment davon, enthält. Je nach Ausgestaltung des diagnostischen Kits können die DNA-Sequenz bzw. der Ligand immobilisiert sein.

**Kurze Beschreibung der Figuren:**

**Fig. 1:** Vergleich der Aminosäuresequenzen von *rrn3p* aus *S.cerevisiae* (*rrn3p*) und homologen Proteinen aus *S. pombe* (*pombe*), *C. elegans* (*cec36e8*) und *Arabidopsis thaliana* (ATAC)

**Fig. 2:** humane cDNA-Sequenz TIF-IA und abgeleitete Aminosäuresequenz

**Fig. 3:** Northern-Blot-Analyse

Zum Nachweis von TIF-IA-Sequenzen wurden aus verschiedenen Geweben extrahierte RNAs (Clontech: 7760-1) mit radioaktiv markierter TIF-IA cDNA (Clon pBS-hTIF-IA) hybridisiert und anschließend eine Autoradiographie erstellt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1: Identifizierung einer TIF-IA cDNA-Sequenz**

Es sind Genprodukte von Hefegenen bekannt, die für die Pol I Transkription in *S. cerevisiae* erforderlich sind. Bei einem der Genprodukte, *rrn3p*, handelt es sich um ein 72 kDa Protein, das mit der drittgrößten Untereinheit von Pol I (RPA49) assoziiert ist. Dieses scheint in stationären Hefekulturen entweder nicht vorhanden oder transkriptionell inaktiv zu sein. Solche Eigenschaften charakterisieren auch TIF-IA. Der Anmelder hat daher vermutet, daß es sich bei *rrn3p* und TIF-IA um funktionell homologe Proteine handeln könnte. Er hat daher eine umfangreiche Suche in verschiedenen Datenbanken

durchgeführt, um Informationen über die mögliche Existenz eines *rrn3p*-homologen Proteins in anderen Organismen zu erhalten. Mit Hilfe des "BLAST"-Programms hat er Homologien zwischen *rrn3p* aus *S.cerevisiae* und einem Genprodukt aus *S. pombe* (Swissprot ID YAQA\_SCHPO), einem Genprodukt aus *Arabidopsis thaliana* (PID:g3132470) und einem Genprodukt aus *C. elegans* (PID:g3924707) identifiziert. Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen sind in Fig. 1 gezeigt. Diese wurden nach dem Algorithmus von Vingron und Argos, *J.Mol.Biol.* 218 (1991), 33-43, durchgeführt und zeigen in Großbuchstaben die konservierten Bereiche. Hieraus konnte folgende Konsensussequenz für den C-terminalen Bereich abgeleitet werden:

FNSLFKSFENTVLNTYKSRYTQFLIFYACSLDPENCDXFLSKLVEVFLSSNKAXAKRQASA  
RYIGSYVARAKTLNKDTIPXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXERHQIFYSGCQAIFYV  
FCFRMREFLDVDRFRSQETRXXXERIVMSKLNPLKYCSPNVVLEFARIAKELGLFYVSSII  
EFNDLLRS

Mit dieser "Core"-Sequenz hat der Anmelder humane ESTs und genomische Sequenzbanken durchsucht. Dabei wurden drei Homologie-Bereiche in der genomischen Sequenz eines "BAC"-Clons (CIT987SK-270G1, "Genbank"-Zugangsnummer AF001549) gefunden. Es wurde in einem Bereich von ca. 10.000 Basen, der die gefundenen Homologien enthält, mit dem Programm "GENSCAN" eine Exonvorhersage berechnet, die die drei gefundenen homologen Bereiche in der konservierten Region als codierende Sequenzen bestätigte. Ausgehend von dieser Sequenz wurde das 5' Ende des zu *rrn3p* homologen Gens mit einem 5'RACE aus einer humanen fötalen cDNA-Bank bestimmt. Durch "gene walking", gezielte PCR-Strategien, Hybridisierungstechniken, 3'RACE, Sequenzierung und Zusammenfügung der einzelnen Genabschnitte wurde letztlich ein cDNA-Clon erhalten, der für TIF-IA mit einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa codiert. Die Nucleinsäuresequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Fig. 2 dargestellt. Dieser cDNA-Clon wurde mit pBS-hTIF-IA bezeichnet. Er wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) unter DSM 12707 am 25.2.1999 hinterlegt.

**Beispiel 2: Nachweis von TIF-IA-Sequenzen in Geweben**

Käufliche Filter (Clontech: 7760-1), die RNAs von Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas enthalten, wurden einer Hybridisierung mit  $[\alpha^{32}\text{P}]$  dCTP markierter PBS-hTIF-IA cDNA von Beispiel 1 unterworfen. Die Hybridisierung erfolgte bei 65° C in 5 x SSPE, 1 % SDS, 1 x Denhardts-Lösung. Nach der Hybridisierung wurde zuerst mit 2 x SSC, 1 % SDS und danach mit 0,2 x SSC bei 65° C gewaschen.

Es zeigte sich, daß TIF-IA-Sequenzen in den verschiedensten Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden.

**Beispiel 3: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA.**

Die DNA von Fig. 2 wurde mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQE-8/TIF-IA erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Tif-IA von Fig. 2 (C-Terminuspartner). pQE-8/TIF-IA wurde zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 $\mu\text{M}$  Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in

hochreiner Form hergestellt werden kann.

**Patentansprüche**

1. DNA-Sequenz, kodierend für einen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA mit der in Fig. 2 gezeigten Aminosäuresequenz.
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, wobei sie die in Fig. 2 gezeigte Nucleinsäuresequenz umfaßt.
3. DNA-Sequenz, kodierend für ein Protein mit den biologischen Eigenschaften eines RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA, wobei die DNA-Sequenz
  - (a) sich von der DNA-Sequenz von Anspruch 2 in der Codonsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet;
  - (b) mit der DNA-Sequenz von Anspruch 2 oder 3(a) hybridisiert; oder
  - (c) ein Fragment, eine allelische Variante oder eine andere Variante der DNA-Sequenz von Anspruch 2, 3(a) oder 3(b) ist.
4. Ribozym, wobei es zu der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 komplementär ist und an die von dieser DNA-Sequenz transkribierte RNA spezifisch binden und diese spalten kann, wodurch die Synthese des von dieser DNA-Sequenz codierten Proteins verringert oder gehemmt wird.
5. Antisense-RNA, wobei sie zu der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 komplementär ist und an die von dieser DNA-Sequenz transkribierte RNA spezifisch binden kann, wodurch die Synthese des von dieser DNA-Sequenz codierten Proteins verringert oder gehemmt wird.
6. Expressionsvektor, wobei er die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 enthält oder für das Ribozym nach Anspruch 4 oder die Antisense-RNA nach Anspruch 5

kodiert.

7. Wirtszelle, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 6.
8. RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA oder Protein mit dessen biologischer Aktivität, das (der) durch die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert wird.
9. Verfahren zur Herstellung eines RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8, das die Züchtung der Wirtszelle nach Anspruch 7 unter geeigneten Bedingungen und die Gewinnung des Proteins aus der Zelle oder dem Zuchtmittel umfaßt.
10. Ligand, der an den RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA oder ein Protein mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8 bindet.
11. Ligand nach Anspruch 10, der ein Antikörper oder ein Fragment davon ist.
12. Antagonist, der die Wirkung des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8 abschwächt oder blockiert.
13. Verwendung der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, des Expressionsvektors nach Anspruch 6, des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8 zur Prävention oder Behandlung von Erkrankungen, die mit einer verringerten Zellproliferation assoziiert sind oder zur Stimulation der Zellproliferation.

14. Verwendung der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, des Expressionsvektors nach Anspruch 6, des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8 zur Förderung der Geweberegeneration.
15. Verwendung des Ribozyms nach Anspruch 4, der Antisense-  
RNA nach Anspruch 5, des Expressionsvektors nach  
Anspruch 6, des Liganden nach Anspruch 10 oder des  
Antagonisten nach Anspruch 12 zur Prävention oder  
Behandlung von Erkrankungen, die mit einer erhöhten  
Zellproliferation assoziiert sind, oder zur Hemmung der  
Zellproliferation.
16. Verwendung des Ribozyms nach Anspruch 4, der Antisense-  
RNA nach Anspruch 5, des Expressionsvektors nach  
Anspruch 6, des Liganden nach Anspruch 10 oder des  
Antagonisten nach Anspruch 12 zur Krebstherapie.
17. Diagnoseverfahren zum Nachweis einer eventuell  
gestörten TIF-IA Expression, bei dem man eine Probe mit  
der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder  
dem Liganden nach Anspruch 10 in Berührung bringt und  
sodann direkt oder indirekt bestimmt, ob sich die  
Konzentration, Länge und/oder Sequenz des RNA  
Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder der  
diesen codierenden mRNA im Vergleich zu einer  
Kontrollprobe unterscheiden.
18. Diagnostischer Kit zur Durchführung des Verfahrens nach  
Anspruch 17, der die DNA-Sequenz nach einem der  
Ansprüche 1 bis 3 und/oder den Liganden nach Anspruch  
10 enthält.

mmafentskrppqdfvapidqkkkrkvqfsdstdglvtlqpeeiakdevfsaa-----	rrn3p
-----mpsiisstnpqyinkcvnngtmasstnvpdrtvgsksfassvskndgr1mq	pombe
-----mk-stanapklspkhesesdpkkvkleeekptvnqa	cec36e8
-----mgavelmsdpsslctvenyvdnvda	ATAC
-mysrfvksaldddkndstqigianqvalpskNP----eriNDKLNJLLDILSSNIN	rrn3p
qmirafrvnkald--dkaegr.fagyedlrrqfaakSD--tkdapSSLQJQNLLSALTCNVS	pombe
ptgreiveny1kgdvttaavlyrkicnaletfeqwES----eapKIQLDDQFLNIADEA	cec36e8
lsdtqlvqtvrkaltsvktgdsdlysemvgvmarDIkefkdpdVVAQLETVLKALSGAVA	ATAC
RIESsrgtfLIQSIINFEKWW-E-LPPHTLSKYIYFIKilcssipkwwqgdvsmilvscfil	rrn3p
RLDSsnss-LVMSVLDS--VVVsRDESFVRCYTRFLgnlisagqsrylplvmtm.ighml-	pombe
RTET----LVKRLLSL--RWDKIPGSVIERFRNLFcelairhlcfteevysavverlvp	cec36e8
CIDV1hhqkL-SALFRMK-LWD-HRPDVMDALVNLvislavtsgxyldscinumjvsnfvp	ATAC
pi-----KQTvch-----HDMLKFLRMIPSSMGFIDTYLAKFFPNKNDTR	rrn3p
-----yrdpSLAI---hyehaHMALKYVLELVPRAHFLYSSILEEPYKDESL	pombe
qisvteetgvvtlILTEkvqnehfemahHISSVLRCPPLSARALLKCVKRVMPHFRPS	cec36e8
ppwvnnnls-hsrILNKKi---dvltsrvHAALLKISILVPLTPSRLVPMFLQQQMPKMHKKD	ATAC
RKLVNYTSNLLKLRGYCSE--LGFOIWSLLIEKIISIDVELqneIadeldddvdadddeev	rrn3p
LAQMTYISNVLSICEYVPS--IKGPVLHAIIDKIIQIDVEIqvevddde-----	pombe
VTVAGYMRNLLIMQKYIPAS-ISKDVWEAVFERLAKDDTHN-----w	cec36e8
HSIVIYVESLLKLENSSIGqvGGSMILGMVMERLRLDVSRqnmlq1rs-----iei	ATAC
dIeddddldddSgddddecngnsneelRsgaadgssqsdsedm-----	rrn3p
--eedevvrtddDgtsnadsevitastLyE-----	pombe
kceqneemsksP-----rlfalnddiLiEevvegntndseadvtpeqleqrkgeqmiqyld	cec36e8
ewddipqddssRgmfdme-----L-Edaaegtmdngdclpvpgplkq-----	ATAC
---diiegmdgteeeynVLTQGIKELSTKLDSILtLVSTHVEEqvtpeslesgegvGVF	rrn3p
rhtaissemstsstiltppSLDT-RQLMQQLDQLLyTLFSYLDsNlkstsrsdr---yLVY	pombe
svctdvitfirssvdseiDEENG-NERTKLNDKWL-RNFKITGDKvlpke-----KLF	cec36e8
-----DTSDG-SIVSKLLDKLMvVAFEHLEScqndgrld----QVF	ATAC
NTLTTLFKTHVLPTYYTRS1QY1MFHVSQQQLEL-MDSFLVTLIDIsfavnneaekkiks	rrn3p
NSLIKSFSVNTVLTFRCRYTQFLIFWASQLDPEF-TDIFLGVLTEvc1---dpsqpytlr	pombe
DTFLECLESTMLNATHVQYVFSFIWLYFCSLSQEY-EKKMLEHLWQVtirmprapadarks	cec36e8
ESLFKSFSFENFILNTYKSFKFTQFLIFYACSLDPENCGVKFASKLVEI-----	ATAC
---lqylgsyiarakksrtqifvaysyltswinRYVIEREEEVDQ-rggmERFKHFYAA	rrn3p
lsgamyigsyvarakalekntiqiivrnmmtrwveAYLDQCENELSd1--1SKHSVFYAI	pombe
qgaasylaflarakyvkkstaf:leevyiwlrHYVDQFGSGSSQilpglQRHCTFYSV	cec36e8
-----fissnkhvatrqasrlidacv---GYCRTCNDDTRP----EAHQIFFSG	ATAC
FQALCYIFCFRHNIFRDTDGN-----weceldkFFQRMVISKFNPFLKFCNENVMLM	rrn3p
NQSIFYIFCFRWRELCVSDESmesmprpnewipgle-ILHRSVLSRLNPLRYCSPNIVLQ	pombe
SQAFFLVFAFRYKEFVKNKDMletirr-----wGVGRVVHSPLEPLKYVSKPVARC	cec36e8
CQAIMYVLCFRMRSILDVPRFrsqlt-----PLESILMHKLNPLMVCLPSVVAE	ATAC
FARIAQQESVAYCFSiiennnnneRLPGIIGKadsdkkensagarttssswslat:qqfid	rrn3p
FAKVANHLMNFMYVYSii---eqNRKGIFRE-----gfdt	pombe
PSAITSRSLQLVYCNHii-----PIEEVQRP-----	cec36e8
FLRQAKEGGLFIVSDSf-ifdd1LESELSRAfgg-----fer	ATAC
LQSYFPYDPLFLKNYK1LMKEYY-----IEWSEASGEYESDGSSDD---	rrn3p
MDAYFPFPDPYRLTKSSIIIVQPFY-----NEWQQIPGLDDDEEEEDtaye	pombe
FDDMFPPFDYCHLKESSKFMTPLMrkfspaedmstlkaICWNAATADKSEKSAEAvsss	cec36e8
LDFFFPPFDPCLLKSSNSFISPNF-----IYWSMVKATYDEDDDDNdaev	ATAC
-----sscvmlges-----pf-----	rrn3p
egldf1deddamummgssgyrextfscgqs-----slinysatpglqtfnv---	pombe
ivngdedsdeddeadlyalnkmsitpkhsfkndmerdrllrmpsrpstspesl-----	cec36e8
-----	ATAC

Fig 1: Sequenzalignment

1 GGAGCGGCCGCCAGGTGCAGTCGGTTAGTTGGCCAAATGGCGCACCGCTGCTTCAC  
 M A A P L L H -  
 61 AC CG TT G C C G G G A G A T G C G G C C G T T C G T C C T C T G C A G T A A G A A G C T G G G C C G T C G  
 T R L P G D A A A S S S A V K K L G A S -  
 120 AGGACTGGGATTTCAAATATGCCTGCATTAGAGAATGACTTTTCATAATTCTCCCCAAGA  
 R T G I S N M R A L E N D F F N S P P R -  
 181 AAAACTGTTGGCTTGGTGGAACTGTCAGACAGACTTGCTGAAGTACAAAAAGGGTGA  
 K T V R F G T V T E V L L K Y K K G E -  
 241 ACAAAATGACTTTGAGTTGGTGAAGAACCCAGCTGTTAGATCCAGACATAAAAGGATGACCAG  
 T N D F E L L K N Q L L D P D I K D D Q -  
 301 ATCATCAACTGGCTGCTAGAATTCCGTTCTCTATCATGTACTTGACAAAAGACTTGAG  
 I I N W L L E F R S S I M Y L T K D F E -  
 361 CAACTTATCACTATTATTAAGATTGCTTGGTTGAATAGAAGTCAAACAGTAGTGAA  
 Q L I S I I L R L P W L N R S Q T V V E -  
 421 GAGTATTTGGCTTTCTGGTAATCTGTATCAGCACAGACTGTTTCCTCAGACCGTGT  
 E Y L A F L G N L V S A Q T V F L R P C -  
 481 CTCAGCATGATTGCTTCCATTGCTCCAGACTGATCATTAAGGAAGGCATGTA  
 L S M I A S H F V P P R V I I K E G D V -  
 541 GATGTTTCAGATTCTGATGATGAAGATGATAATCTCCTGCAAATTGACACATGTCAC  
 D V S D S D D E D D N L P A N F D T C H -  
 601 AGAGCCTTGCAAATWAGCAAGATATGTACCATCGACACCGTGGTTCTCATGCCAATA  
 R A L Q I I A R Y V P S T P W F L M P I -  
 661 CTGGTGGAAAATTCCATTGTTGAAAATCAGAGAGAACACTGGAATGTTACGTTCAT  
 L V E K F P F V R K S E R T L E C Y V H -  
 721 RACTTACTAAGGATTAGTGTATATTCCAACCTTGAGGCATGAAATTCTGGAGCTTATT  
 ? L L R I S V Y F P T L R H E I L E L I -  
 781 ATTGAAAAACTACTCAAGTTGGATGTGAATGCATCCGGCAGGGTATTGAAGATGCTGAA  
 I E K L L K L D V N A S R Q G I E D A E -  
 841 GAAACAGCACTCAAACCTGTGGGGACAGATTCCACGGAAGGATTGTTAATATGGAT  
 E T A T Q T C G G T D S T E G L F N M D -  
 901 GAAGATGAAGAAACTGAACATGAAACAAAGGCTGGTCTGAACGGCTCGACCAGATGGT  
 E D E E T E H E T K A G P E R L D Q M V -  
 961 CATCCTGTAGCGAGCGCTGGACATCTGATGTCCTGGCTTCTACATGAAGGAT  
 H P V A E R L D I L M S L V L S Y M K D -  
 1021 GTCTGCTATGTAGATGGTAAGGTTGATAACGGCAAAACAAAGGATCTATATCGCGACCTG  
 V C Y V D G K V D N G K T K D L Y R D L -  
 1081 ATAAACATCTTGACAAACTCCTGTTGGCCACCCATGCCCTGCCATGTACAGTTTC  
 I N I F D K L L P T H A S C H V Q F F -  
 1141 ATGTTTACCTCTGTAGTTCAAATTGGGATTGGCAGAGGCATTGGAAACATCTCTGG  
 M F Y L C S F K L G F A E A F L E H L W -  
 1201 AAAAATTGCAAGGACCCAGTAATCCTGCCATCATCAGGCAGGGCTGCTGGAAATTATATT  
 K K L Q D P S N P A I I R Q A A G N Y I -  
 1261 GGAAGCTTTGGCAAGAGCTAAATTATTCCCTCTTATTACTGTAAAATCATGCCAGAT  
 G S F I A D K P T N V K C G Y C S C G Y C

FIGUR 2/3 (Fortsetzung)

1321 CTTTGGTTAACGGCTGCACATATACCTTAATAACCAGGATTCGGGAACAAAGGCATTC  
L L V N W L H I Y L N N Q D S G T K A F -

1381 TCGCATGTTGCTCTCCATGGACCATTTACTCAGCCTGCCAAGCTGTGTTCTACRCCTT  
C D V A L H G P F Y S A C Q A V F Y ? F -

1441 GTTTTAGACACAAGCAGCTTTGAGCGGAAACCTGAAAGAAGGTTGCAGTATCTTCAG  
V F R H K Q L L S G N L K E G L Q Y L Q -

1501 AGTCTGAATTTGAGCGGATAGTGTGAGCCAGCTAAATCCCTGAAGATTGCTGCC  
S L N F E R I V M S Q L N P L K I C L P -

1561 TCAGTGGTTAACCTTTGCTGCAATCACAAATAAGTACCAAGCTCGTCTCTGCTACACC  
S V V N F F A A I T N K Y Q L V F C Y T -

1621 ATCATTGAGAGGAACAATGCCAGATGCTGCCAGTCATTAGGAGTACCGCTGGAGGAGAC  
I I E R N N R Q M L P V I R S T A G G D -

1681 TCAGTCCAGATCTGCACAAACCCGCTGGACACCTCTTCCCTTGATCCCTGTGCTG  
S V Q I C T N P L D T F F P F D P C V L -

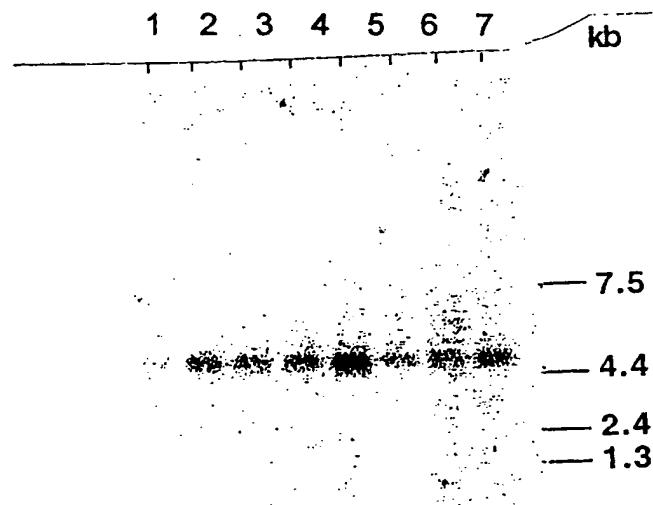
1741 AAGAGGTCAAAGAAAATTGATCCTATTTATCAGGTGTGGGAAGACATGAGTGCTGAA  
K R S K K F I D P I Y Q V W E D M S A E -

1801 GAGCTACAGGAGTTCAAGAAACCCATGAAAAAGGACATAGTGGAAAGATGAAGATGATGAC  
E L Q E F K K P M K K D I V E D E D D D -

1861 TTTCTGAAAGGCGAAGTGCCTCCAGAATGATACCGTGATTGGGATCACACCAAGCTCCTT  
F L K G E V P Q N D T V I G I T P S S F -

1921 GACACGCATTTCCGAGTCCTCAAGTAGTAGTGTGGCTCCCCACCCGTGTGACATGCAA  
D T H F R S P S S V G S P P V L Y M Q -

1981 CCCAGTCCCCCTGTACGGAGAAATTGTGACTGAGATGTGACATTGGGATTCCCCATC  
P S P L -

FIGUR 3/3

- Spur 1: Herz
- Spur 2: Hirn
- Spur 3: Plazenta
- Spur 4: Lunge
- Spur 5: Leber
- Spur 6: Sk. Muskel
- Spur 7: Niere
- Spur 8: Pankreas

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 199 11 992.9

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2040 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 40..1992

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGAGCGGCCG CCCAGGTGCG GTCGCGTTAGT TCGGCCCA ATG GCG GCA CCG CTG	54
Met Ala Ala Pro Leu	
1	5
CTT CAC ACG CGT TTG CCG GGA GAT GCG GCC GCT TCG TCC TCT GCA GTT	102
Leu His Thr Arg Leu Pro Gly Asp Ala Ala Ser Ser Ser Ala Val	
10	15
15	20
AAG AAG CTG GGC GCG TCG AGG ACT GGG ATT TCA AAT ATG CGT GCA TTA	150
Lys Lys Leu Gly Ala Ser Arg Thr Gly Ile Ser Asn Met Arg Ala Leu	
25	30
30	35
GAG AAT GAC TTT TTC AAT TCT CCC CCA AGA AAA ACT GTT CGG TTT GGT	198
Glu Asn Asp Phe Phe Asn Ser Pro Pro Arg Lys Thr Val Arg Phe Gly	
40	45
45	50
GGA ACT GTG ACA GAA GTC TTG CTG AAG TAC AAA AAG GGT GAA ACA AAT	246
Gly Thr Val Thr Glu Val Leu Leu Lys Tyr Lys Lys Gly Glu Thr Asn	
55	60
60	65
GAC TTT GAG TTG TTG AAG AAC CAG CTG TTA GAT CCA GAC ATA AAG GAT	294
Asp Phe Glu Leu Leu Lys Asn Gln Leu Leu Asp Pro Asp Ile Lys Asp	
70	75
75	80
80	85

GAC CAG ATC ATC AAC TGG CTG CTA GAA TTC CGT TCT TCT ATC ATG TAC	342
Asp Gln Ile Ile Asn Trp Leu Leu Glu Phe Arg Ser Ser Ile Met Tyr	
90 95 100	
TTG ACA AAA GAC TTT GAG CAA CTT ATC AGT ATT ATA TTA AGA TTG CCT	390
Leu Thr Lys Asp Phe Glu Gln Leu Ile Ser Ile Ile Leu Arg Leu Pro	
105 110 115	
TGG TTG AAT AGA AGT CAA ACA GTA GTG GAA GAG TAT TTG GCT TTT CTT	438
Trp Leu Asn Arg Ser Gln Thr Val Val Glu Glu Tyr Leu Ala Phe Leu	
120 125 130	
GGT AAT CTT GTA TCA GCA CAG ACT GTT TTC CTC AGA CCG TGT CTC AGC	486
Gly Asn Leu Val Ser Ala Gln Thr Val Phe Leu Arg Pro Cys Leu Ser	
135 140 145	
ATG ATT GCT TCC CAT TTT GTG CCT CCC CGA GTG ATC ATT AAG GAA GGC	534
Met Ile Ala Ser His Phe Val Pro Pro Arg Val Ile Ile Lys Glu Gly	
150 155 160 165	
GAT GTA GAT GTT TCA GAT TCT GAT GAT GAA GAT GAT AAT CTT CCT GCA	582
Asp Val Asp Val Ser Asp Ser Asp Asp Glu Asp Asp Asn Leu Pro Ala	
170 175 180	
AAT TTT GAC ACA TGT CAC AGA GCC TTG CAA ATA ATA GCA AGA TAT GTA	630
Asn Phe Asp Thr Cys His Arg Ala Leu Gln Ile Ile Ala Arg Tyr Val	
185 190 195	
CCA TCG ACA CCG TGG TTT CTC ATG CCA ATA CTG GTG GAA AAA TTT CCA	678
Pro Ser Thr Pro Trp Phe Leu Met Pro Ile Leu Val Glu Lys Phe Pro	
200 205 210	
TTT GTT CGA AAA TCA GAG AGA ACA CTG GAA TGT TAC GTT CAT NAC TTA	726
Phe Val Arg Lys Ser Glu Arg Thr Leu Glu Cys Tyr Val His Xaa Leu	
215 220 225	
CTA AGG ATT AGT GTA TAT TTT CCA ACC TTG AGG CAT GAA ATT CTG GAG	774
Leu Arg Ile Ser Val Tyr Phe Pro Thr Leu Arg His Glu Ile Leu Glu	
230 235 240 245	
CTT ATT ATT GAA AAA CTA CTC AAG TTG GAT GTG AAT GCA TCC CGG CAG	822
Leu Ile Ile Glu Lys Leu Leu Lys Leu Asp Val Asn Ala Ser Arg Gln	
250 255 260	
GGT ATT GAA GAT GCT GAA GAA ACA GCA ACT CAA ACT TGT GGT GGG ACA	870
Gly Ile Glu Asp Ala Glu Glu Thr Ala Thr Gln Thr Cys Gly Gly Thr	
265 270 275	
GAT TCC ACG GAA GGA TTG TTT AAT ATG GAT GAA GAT GAA GAA ACT GAA	918
Asp Ser Thr Glu Gly Leu Phe Asn Met Asp Glu Asp Glu Glu Thr Glu	
280 285 290	
CAT GAA ACA AAG GCT GGT CCT GAA CGG CTC GAC CAG ATG GTG CAT CCT	966
His Glu Thr Lys Ala Gly Pro Glu Arg Leu Asp Gln Met Val His Pro	
295 300 305	
GTA GCC GAG CGC CTG GAC ATC CTG ATG TCT TTG GTT TTG TCC TAC ATG	1014
Val Ala Glu Arg Leu Asp Ile Leu Met Ser Leu Val Leu Ser Tyr Met	
310 315 320 325	
AAG GAT GTC TGC TAT GTA GAT GGT AAG GTT GAT AAC GGC AAA ACA AAG	1062
Lys Asp Val Cys Tyr Val Asp Gly Lys Val Asp Asn Gly Lys Thr Lys	
330 335 340	
GAT CTA TAT CGC GAC CTG ATA AAC ATC TTT GAC AAA CTC CTG TTG CCC	1110
Asp Leu Tyr Arg Asp Leu Ile Asn Ile Phe Asp Lys Leu Leu Pro	
345 350 355	

ACC CAT GCC TCC TGC CAT GTA CAG TTT TTC ATG TTT TAC CTC TGT AGT	1158
Thr His Ala Ser Cys His Val Gln Phe Phe Met Phe Tyr Leu Cys Ser	
360 365 370	
TTC AAA TTG GGA TTC GCA GAG GCA TTT TTG GAA CAT CTC TGG AAA AAA	1206
Phe Lys Leu Gly Phe Ala Glu Ala Phe Leu Glu His Leu Trp Lys Lys	
375 380 385	
TTG CAG GAC CCA AGT AAT CCT GCC ATC ATC AGG CAG GCT GCT GGA AAT	1254
Leu Gln Asp Pro Ser Asn Pro Ala Ile Ile Arg Gln Ala Ala Gly Asn	
390 395 400 405	
TAT ATT GGA AGC TTT TTG GCA AGA GCT AAA TTT ATT CCT CTT ATT ACT	1302
Tyr Ile Gly Ser Phe Leu Ala Arg Ala Lys Phe Ile Pro Leu Ile Thr	
410 415 420	
GTA AAA TCA TGC CTA GAT CTT TTG GTT AAC TGG CTG CAC ATA TAC CTT	1350
Val Lys Ser Cys Leu Asp Leu Leu Val Asn Trp Leu His Ile Tyr Leu	
425 430 435	
AAT AAC CAG GAT TCG GGA ACA AAG GCA TTC TGC GAT GTT GCT CTC CAT	1398
Asn Asn Gln Asp Ser Gly Thr Lys Ala Phe Cys Asp Val Ala Leu His	
440 445 450	
GGA CCA TTT TAC TCA GCC TGC CAA GCT GTG TTC TAC NCC TTT GTT TTT	1446
Gly Pro Phe Tyr Ser Ala Cys Gln Ala Val Phe Tyr Xaa Phe Val Phe	
455 460 465	
AGA CAC AAG CAG CTT TTG AGC GGA AAC CTG AAA GAA GGT TTG CAG TAT	1494
Arg His Lys Gln Leu Leu Ser Gly Asn Leu Lys Glu Gly Leu Gln Tyr	
470 475 480 485	
CTT CAG AGT CTG AAT TTT GAG CGG ATA GTG ATG AGC CAG CTA AAT CCC	1542
Leu Gln Ser Leu Asn Phe Glu Arg Ile Val Met Ser Gln Leu Asn Pro	
490 495 500	
CTG AAG ATT TGC CTG CCC TCA GTG GTT AAC TTT TTT GCT GCA ATC ACA	1590
Leu Lys Ile Cys Leu Pro Ser Val Val Asn Phe Phe Ala Ala Ile Thr	
505 510 515	
AAT AAG TAC CAG CTC GTC TTC TGC TAC ACC ATC ATT GAG AGG AAC AAT	1638
Asn Lys Tyr Gln Leu Val Phe Cys Tyr Thr Ile Ile Glu Arg Asn Asn	
520 525 530	
CGC CAG ATG CTG CCA GTC ATT AGG AGT ACC GCT GGA GGA GAC TCA GTG	1686
Arg Gln Met Leu Pro Val Ile Arg Ser Thr Ala Gly Gly Asp Ser Val	
535 540 545	
CAG ATC TGC ACA AAC CCG CTG GAC ACC TTC TTC CCC TTT GAT CCC TGT	1734
Gln Ile Cys Thr Asn Pro Leu Asp Thr Phe Phe Pro Phe Asp Pro Cys	
550 555 560 565	
GTG CTG AAG AGG TCA AAG AAA TTC ATT GAT CCT ATT TAT CAG GTG TGG	1782
Val Leu Lys Arg Ser Lys Lys Phe Ile Asp Pro Ile Tyr Gln Val Trp	
570 575 580	
GAA GAC ATG AGT GCT GAA GAG CTA CAG GAG TTC AAG AAA CCC ATG AAA	1830
Glu Asp Met Ser Ala Glu Glu Leu Gln Glu Phe Lys Lys Pro Met Lys	
585 590 595	
AAG GAC ATA GTG GAA GAT GAA GAT GAT GAC TTT CTG AAA GGC GAA GTG	1878
Lys Asp Ile Val Glu Asp Glu Asp Asp Asp Phe Leu Lys Gly Glu Val	
600 605 610	
CCC CAG AAT GAT ACC GTG ATT GGG ATC ACA CCA AGC TCC TTT GAC ACG	1926
Pro Gln Asn Asp Thr Val Ile Gly Ile Thr Pro Ser Ser Phe Asp Thr	
615 620 625	

CAT	TTC	CGA	AGT	CCT	TCA	AGT	AGT	GTG	GGC	TCC	CCA	CCC	GTG	TTG	TAC	1974
His	Phe	Arg	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Ser	Pro	Pro	Val	Leu	Tyr	
630				635				640						645		
ATG	CAA	CCC	AGT	CCC	CTC	TGACGGCAGA	AATTTGTGACTG	AGATGTGACA							2024	
Met	Gln	Pro	Ser	Pro	Leu											
				650												
TTTGGGATTC	CCCATC														2040	

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 651 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	His	Thr	Arg	Leu	Pro	Gly	Asp	Ala	Ala	Ala
1				5				10					15		
Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Ala	Ser	Arg	Thr	Gly	Ile	Ser
				20			25					30			
Asn	Met	Arg	Ala	Leu	Glu	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Ser	Pro	Pro	Arg	Lys
				35			40				45				
Thr	Val	Arg	Phe	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Lys
				50			55				60				
Lys	Gly	Glu	Thr	Asn	Asp	Phe	Glu	Leu	Leu	Lys	Asn	Gln	Leu	Leu	Asp
				65			70			75		80			
Pro	Asp	Ile	Lys	Asp	Asp	Gln	Ile	Ile	Asn	Trp	Leu	Leu	Glu	Phe	Arg
				85				90				95			
Ser	Ser	Ile	Met	Tyr	Leu	Thr	Lys	Asp	Phe	Glu	Gln	Leu	Ile	Ser	Ile
				100			105				110				
Ile	Leu	Arg	Leu	Pro	Trp	Leu	Asn	Arg	Ser	Gln	Thr	Val	Val	Glu	Glu
				115			120				125				
Tyr	Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Gln	Thr	Val	Phe	Leu
				130			135				140				
Arg	Pro	Cys	Leu	Ser	Met	Ile	Ala	Ser	His	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Val
				145			150			155				160	
Ile	Ile	Lys	Glu	Gly	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp	Glu	Asp
				165				170				175			
Asp	Asn	Leu	Pro	Ala	Asn	Phe	Asp	Thr	Cys	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Ile
				180			185				190				
Ile	Ala	Arg	Tyr	Val	Pro	Ser	Thr	Pro	Trp	Phe	Leu	Met	Pro	Ile	Leu
				195			200				205				
Val	Glu	Lys	Phe	Pro	Phe	Val	Arg	Lys	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Glu	Cys
				210			215				220				
Tyr	Val	His	Xaa	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Val	Tyr	Phe	Pro	Thr	Leu	Arg
				225			230			235				240	

His Glu Ile Leu Glu Leu Ile Ile Glu Lys Leu Leu Lys Leu Asp Val  
245 250 255

Asn Ala Ser Arg Gln Gly Ile Glu Asp Ala Glu Glu Thr Ala Thr Gln  
260 265 270

Thr Cys Gly Gly Thr Asp Ser Thr Glu Gly Leu Phe Asn Met Asp Glu  
275 280 285

Asp Glu Glu Thr Glu His Glu Thr Lys Ala Gly Pro Glu Arg Leu Asp  
290 295 300

Gln Met Val His Pro Val Ala Glu Arg Leu Asp Ile Leu Met Ser Leu  
305 310 315 320

Val Leu Ser Tyr Met Lys Asp Val Cys Tyr Val Asp Gly Lys Val Asp  
325 330 335

Asn Gly Lys Thr Lys Asp Leu Tyr Arg Asp Leu Ile Asn Ile Phe Asp  
340 345 350

Lys Leu Leu Leu Pro Thr His Ala Ser Cys His Val Gln Phe Phe Met  
355 360 365

Phe Tyr Leu Cys Ser Phe Lys Leu Gly Phe Ala Glu Ala Phe Leu Glu  
370 375 380

His Leu Trp Lys Lys Leu Gln Asp Pro Ser Asn Pro Ala Ile Ile Arg  
385 390 395 400

Gln Ala Ala Gly Asn Tyr Ile Gly Ser Phe Leu Ala Arg Ala Lys Phe  
405 410 415

Ile Pro Leu Ile Thr Val Lys Ser Cys Leu Asp Leu Leu Val Asn Trp  
420 425 430

Leu His Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Asp Ser Gly Thr Lys Ala Phe Cys  
435 440 445

Asp Val Ala Leu His Gly Pro Phe Tyr Ser Ala Cys Gln Ala Val Phe  
450 455 460

Tyr Xaa Phe Val Phe Arg His Lys Gln Leu Leu Ser Gly Asn Leu Lys  
465 470 475 480

Glu Gly Leu Gln Tyr Leu Gln Ser Leu Asn Phe Glu Arg Ile Val Met  
485 490 495

Ser Gln Leu Asn Pro Leu Lys Ile Cys Leu Pro Ser Val Val Asn Phe  
500 505 510

Phe Ala Ala Ile Thr Asn Lys Tyr Gln Leu Val Phe Cys Tyr Thr Ile  
515 520 525

Ile Glu Arg Asn Asn Arg Gln Met Leu Pro Val Ile Arg Ser Thr Ala  
530 535 540

Gly Gly Asp Ser Val Gln Ile Cys Thr Asn Pro Leu Asp Thr Phe Phe  
545 550 555 560

Pro Phe Asp Pro Cys Val Leu Lys Arg Ser Lys Lys Phe Ile Asp Pro  
565 570 575

Ile Tyr Gln Val Trp Glu Asp Met Ser Ala Glu Glu Leu Gln Glu Phe  
580 585 590

Lys Lys Pro Met Lys Lys Asp Ile Val Glu Asp Glu Asp Asp Asp Phe  
595 600 605

Leu Lys Gly Glu Val Pro Gln Asn Asp Thr Val Ile Gly Ile Thr Pro  
610 615 620

Ser Ser Phe Asp Thr His Phe Arg Ser Pro Ser Ser Ser Val Gly Ser  
625 630 635 640

Pro Pro Val Leu Tyr Met Gln Pro Ser Pro Leu  
645 650

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No  
PCT/D/00767

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/12	C07K14/47	C12N9/00	C07K16/18	C12Q1/68
	G01N33/68	C12N15/11	A61K31/70	A61K38/17	

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, STRAND, WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YAMAMOTO ROBERT T ET AL: "RRN3 gene of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template."</p> <p>EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 15, no. 15, 1996, pages 3964-3973, XP002143816</p> <p>ISSN: 0261-4189</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-9

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

1 August 2000

18/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Corne, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nat Application No  
PCT/EP 00/00767

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHNAPP ANDREAS ET AL: "Function of the growth-regulated transcription initiation factor TIF-IA in initiation complex formation at the murine ribosomal gene promoter." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 11, November 1993 (1993-11), pages 6723-6732, XP000929632 ISSN: 0270-7306 cited in the application the whole document -----	1
A	D. BUTTGEREIT ET AL: "Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiation factor (TIF-IA)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 13, no. 22, 25 November 1985 (1985-11-25), pages 8165-8180, XP002143818 OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY., GB ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document -----	
A	NCI-CGAP: "National cancer institute, cancer genome anatomy project (CGAP)," EMBL DATABASE ENTRY HSAA25257, ACCESSION NUMBER AA213789, 3 February 1997 (1997-02-03), XP002143819 abstract -----	1-3
T	MOOREFIELD BETH ET AL: "RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 9, 25 April 2000 (2000-04-25), pages 4724-4729, XP002143820 April 25, 2000 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	1-9

## ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

## Continuation of box I.1

Although claims 13-16 relate to a method for the treatment of the human/animal body (Rule 39.1 IV PCT), a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

Although claim 17 (as far as it relates to in vivo methods) relates to a diagnostic method (Rule 13.1 IV PCT) carried out on the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

## Continuation of box I.2

Claims Nos.: 10, 12, 15-18 partially

Present claims 10 and 12 relate to a product and claims 15 to 18 to the use of said product, which is characterized by a desired feature or property, namely a ligand that binds to an RNA polymerase I transcription factor TIF-IA or an antagonist that attenuates or blocks the effect of the RNA polymerase I transcription factor TIF-IA and its uses.

The patent claims therefore comprise all products etc. that have this feature or property while the patent application is supported by the description only for a limited number of such products etc. in the sense of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. The claims also lack the required novelty (Article 6 PCT) since the product is defined by the respective desired result. The patent application lacks the required clarity to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. For this reason, the search was restricted to parts of the claims that seemed to be clear, supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e. those parts that relate to the products that are antibodies against the RNA polymerase I transcription factor TIF-IA.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/00767

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N9/00 C07K16/18 C12Q1/68  
G01N33/68 C12N15/11 A61K31/70 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, STRAND, WPI Data, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>YAMAMOTO ROBERT T ET AL: "RRN3 gene of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template."  <b>EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL</b>,          Bd. 15, Nr. 15, 1996, Seiten 3964-3973,          XP002143816          ISSN: 0261-4189          das ganze Dokument</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	1-9

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Rechercheberichts

1. August 2000

18/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Le Corne, N

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internes Aktenzeichen  
PCT/00767

## "C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCHNAPP ANDREAS ET AL: "Function of the growth-regulated transcription initiation factor TIF-IA in initiation complex formation at the murine ribosomal gene promoter." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 13, Nr. 11, November 1993 (1993-11), Seiten 6723-6732, XP000929632 ISSN: 0270-7306 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1
A	D. BUTTGEREIT ET AL: "Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiation factor (TIF-IA)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., Bd. 13, Nr. 22, 25. November 1985 (1985-11-25), Seiten 8165-8180, XP002143818 OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY., GB ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	
A	NCI-CGAP: "National cancer institute, cancer genome anatomy project (CGAP)," EMBL DATABASE ENTRY HSAA25257, ACCESSION NUMBER AA213789, 3. Februar 1997 (1997-02-03), XP002143819 Zusammenfassung -----	1-3
T	MOOREFIELD BETH ET AL: "RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 97, Nr. 9, 25. April 2000 (2000-04-25), Seiten 4724-4729, XP002143820 April 25, 2000 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument -----	1-9

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Fortsetzung von Feld I.1	
<p>Obwohl die Ansprüche 13-16 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen (regel 39.1 IV PCT), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p> <p>Obwohl die Anspruch 17 (so weit es sich um in vivo methoden handelt) sich auf ein Diagnostizierverfahren Regel 13.1 IV PCT), das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung</p>	
Fortsetzung von Feld I.2	
Ansprüche Nr.: 10, 12, 15-18 teilweise	
<p>Die geltenden Patentansprüche 10 und 12 beziehen sich auf ein Produkt und Ansprüche 15-18 auf die Verwendungen dieses Produkts, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich ein Ligand, der an den RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA bindet oder ein Antagonist, der die Wirkung des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA abschwächt oder blockiert und seine Verwendungen.</p> <p>Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. gestützt wird. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht entsprechend gestützt bzw. fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Produkte, die Antikörper gegen den RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA sind.</p>	
<p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.</p>	